

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/86, A61K 48/00, A61P 35/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/50618 (43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01069 (22) 国際出願日 2000年2月24日(24.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/93263 1999年2月24日(24.02.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 癌研究会(JURIDICAL FOUNDATION)[JP/JP] 〒170-0012 東京都豊島区上池袋一丁目37番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 濱田洋文(HAMADA, Hirofumi)[JP/JP] 〒064-0811 北海道札幌市中央区南11条西23丁目2-6 6AP-405 Hokkaido, (JP) (74) 代理人 弁理士 岩橋和幸(IWAHASHI, Kazuyuki) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社 知的財産部 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則 1 3 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。
(54) Title: VIRUS VECTOR (54) 発明の名称 ウイルスベクター (57) Abstract There have been required a virus vector useful in treating and diagnosing tumors such as malignant melanoma having resistance against the conventional therapy and being troublesome in prognosis as well as diagnostic and therapeutic methods for tumors by using such a virus vector. A virus vector constructed by fusing a protein constituting a virus with a ligand binding specifically to melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor and diagnostics and remedies for tumors with the use of this virus vector.		

(57)要約

従来の治療に対して抵抗性で予後のきわめて悪い悪性黒色腫等の腫瘍の治療および診断に有用なウイルスベクターおよび当該ウイルスベクターを用いた腫瘍の診断法および治療法が求められている。

本発明は、ウイルスを構成するタンパク質に、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）受容体に特異的に結合するリガンドを融合させてなるウイルスベクターおよび、該ウイルスベクターを用いた腫瘍に対する診断薬および治療薬を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

ウイルスベクター

技術分野

本発明は、ウイルスを構成するタンパク質に、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）受容体に特異的に結合するリガンドを融合させてなるウイルスベクターおよび、該ベクターを用いた腫瘍に対する診断薬および治療薬に関する。

背景技術

転移を伴う悪性黒色腫は、放射線療法や化学療法などの従来の治療法に抵抗性であり、予後はきわめて不良である。そのため、新しい有効な治療法の開発が強く望まれる。一方、ウイルスベクターなどを介した遺伝子導入を用いた癌治療法（癌に対する遺伝子治療法）は、近年多くの臨床研究が開始され、期待を集めている。

しかしながら、現在、悪性黒色腫に対して十分に治療効果をあげるような効果的な遺伝子導入を行う方法は確立されていない。例えば、従来のレトロウイルス、アデノウイルス、アデノウイルス随伴ウイルス（AAV）などのウイルスベクターでは悪性黒色腫細胞に対する遺伝子導入効率は十分でない。

本発明者らは現行のアデノウイルスベクターの悪性黒色腫細胞株に対する遺伝子導入効率について検討し、比較的高いMOI（multiplicity of infection）のウイルスを用いても十分な遺伝子導入効率を得られないことを示している〔Yoshida et al., Hum Gene Ther., 9 (17) 2503-2515, 1998、（以下、Yoshida et al., 1998と略記する）〕。この論文に示された結果中、MOI100では、A375 ヒト悪性黒色腫細胞で50%、RPMI7951 悪性黒色腫細胞で80%、WM115 悪性黒色腫細胞で50%程度の遺伝子導入効率を得られるに過ぎず、100%に近い遺伝子導入を得るにはさらに大量のアデノウイルスの投与を必要とする。

現行のウイルスベクターは、単に遺伝子導入の効率が低いのみでなく、周辺の正常細胞にも非選択的に遺伝子が導入されるという欠点を持つ。すなわち、

悪性黒色腫の治療を行うベクターとしては、効率が低く、悪性黒色腫に対する選択性も乏しい。

アデノウイルスのファイバーのC末端ないしHIループ部分に変異アミノ酸配列を入れて、宿主域を改変する試みは、米国GenVec社のWickham、アラバマ大学のCurielらのグループによって報告されている [Wickham et al., J. Virol. 71, 8221 (1997)、Wickham et al., Gene Ther. 2, 750 (1995)、Wickham et al., Nat. Biotechnology, 14, 1570 (1996)、Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3, 147 (1992)、Dimitriev et al., J. Virol. 72, 9706 (1998)、W094/10323、W096/07734]。

多くのヒト悪性黒色腫に、MSH受容体が存在しMSHが結合することが報告されている [Siegrist et al., Cancer Res. 49, 6352 (1989)]。したがって、MSHをウイルスの外皮タンパク質に融合させたウイルスベクターは、悪性黒色腫に効率的に遺伝子を導入できるベクターとなることが予想される。しかし、MSHリガンドを含むベクターの作成に成功したとの報告や、MSH受容体を標的とした遺伝子治療の可能性を実証した報告は見当たらない。アデノウイルス以外のウイルスベクターとしては、レトロウイルスのエンベロープタンパク質に細胞の増殖因子（エリスロポエチン） [Kasahara et al., Science 266: 1373 (1994)]、あるいは単鎖の抗体 [Jiang et al. J. Virol. 72(12): 10148 (1998)]などを融合するように組み込んで標的化を目指しているもの、あるいは単純ヘルペスウイルスのC糖タンパク質にエリスロポエチンを融合させたもの [Laquerre et al., J. Virol. 72(12): 9683 (1998)]などがある。Jiangらの報告では、単鎖抗体の抗原としてEGF (epidermal growth factor) 受容体ファミリーに属するHer2neu、骨髄幹細胞に特異的といわれるCD34、トランスフェリン受容体が標的として検討されている。また、インデグリンと結合するRGDモチーフを人工的に組み込んだキメラウイルスタンパク質の報告は、アデノウイルスでは前述のWickhamのグループ [Wickham et al., J. Virol. 71: 8221 (1997)]とCuriel

のグループ [Dimitriev et al., J. Virol. 72: 9706 (1998)] から、さらにアデノウイルス以外では、B型肝炎ウイルスのコアタンパク質 [Chambers et al., J. Virol. 70: 4805 (1996); Sharma et al., Virology 239: 150 (1997)]、バクテリオファージFdタンパク質 [Koivunen et al., J. Biol. Chem. 268: 20205 (1993); Koivunen et al., J. Cell Biol. 124: 373 (1994)] などについてすでに報告されている。しかしながら、アデノウイルス以外でもMSHリガンドを含むウイルスベクターや、MSH受容体を標的とした遺伝子治療の可能性を実証した報告は見当たらない。

発明の開示

悪性黒色腫の遺伝子治療を開発してゆくためには、現行のウイルスベクターでは遺伝子導入の効率および選択性が乏しい。従って、従来の治療に対して抵抗性で予後のきわめて悪い悪性黒色腫に対して、効率よく選択的に遺伝子導入が可能な手段が要望されている。

本発明の目的は、悪性黒色腫を含めた腫瘍の治療および診断に有用な、ウイルスを構成するタンパク質にMSH受容体に特異的に結合するリガンドを融合させてなるウイルスベクターおよび当該ウイルスベクターの利用方法を提供することにある。

本発明者らは、従来のウイルスベクターによる遺伝子導入法では悪性黒色腫に対し効率が低く選択性に乏しいとの上記問題点が、ウイルスを構成するタンパク質に、MSH受容体に特異的に結合するリガンドを融合させてなるウイルスベクターを用いることにより解決できることを見出し、本発明を完成させた。また、このようなウイルスベクターは、作用機作上、アデノウイルスのファイバーと同様に、ウイルスを構成するタンパク質にMSH受容体に特異的に結合するリガンドを融合させることができる他のウイルスを用いたベクター系にも適用できる。

このようなウイルスベクターを悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫

瘍に対して遺伝子導入用のベクターとして用いれば、効率がよく選択性に優れた遺伝子導入が達成される。

従って、本発明によれば、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対して高効率かつ高選択性のウイルスベクター、さらにはそれをもとにして作成される組換えウイルスベクターが提供される。このような組換えウイルスベクターは、含有させる遺伝子を選ぶことによって、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍細胞を特異的に見分ける診断薬として、または当該腫瘍細胞を特異的に殺す癌治療薬として、あるいは当該腫瘍の持つ抗原性を特異的に高める癌の免疫治療剤として適用できる、診断用並びに治療用のベクターとして有用である。

従来のアデノウイルスベクターは、ヒト5ないし2型アデノウイルスをベースとした組換え体が主体で、悪性黒色腫に対する遺伝子導入効率は、50%導入を得られるウイルス量 (ED_{50}) がMOI100前後である (Yoshida et al., 1998)。すなわち、悪性黒色腫に対しては余り高い導入効率が得られない。一方、正常細胞に対してもそれと同等ないしそれ以上の高い効率で遺伝子導入が得られるため、悪性黒色腫に特異的な高い遺伝子導入効率は望めない。本発明のウイルスベクターを用いることにより、1) 悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対して従来法に比べ飛躍的に高い導入効率が得られ、2) 周辺の正常細胞に対しては、従来のベクターと同等ないしそれ以下の導入効率であるため、結果として、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対して特異性の高い遺伝子導入が可能である。そのため、1) 高い発現量が必要な場合は、従来法と同じウイルス量を用いたとしても、標的となる腫瘍細胞に対し従来法よりも高い遺伝子発現が得られ、結果としてより高い効果が得られる。また、2) 比較的低い発現量で十分な効果が得られるような遺伝子の場合には、本ベクターを用いればウイルスの投与量を減らすことが可能であり、結果としてウイルス投与に伴う望ましくない副作用（アレルギー反応や周辺正常細胞の傷害など）を軽減

することが可能である。

また、EIAを持つアデノウイルスなどの増殖可能な組換えウイルスと一体型に組み合わせて用いれば、感染効率の増加と、感染したあとの腫瘍組織内でのウイルスの増殖再感染とが相乗的に働き、非常に有効な治療法となる。

従って、本発明は、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍の治療に対して高い有用性を有している。

ファイバータンパク質のC末端などにMSHとは別種のリガンドを入れた変異アデノウイルスの作成はすでに報告がある。しかし、リガンドを入れたためにアデノウイルスができなくなってしまうものが多い。たとえウイルスができたとしても、得られたものが期待通りの受容体に対するアフィニティーを有していないものである場合も多い〔Wickham et al., J. Virol., 71 (11), 8221-8229 (1997) 参照〕。従って、既に知られているリガンドから派生する融合タンパク質を用いて、すでに知られている受容体を標的としたベクターであっても、有用なウイルスベクターが得られるか否かは実際にそれらを作成して、作用させてみるまでは全く不明である。例えば、Wickhamらは、E-セレクトインと結合するモチーフ配列 (TRSDITWDQLWWDLMKTS) やラミニンリセプターと結合するモチーフ配列 (TSAA(SIKVAV)₂) をアデノウイルスのファイバーのC末端に挿入したベクターを作製したが、組換えアデノウイルスはできなかった。また、同様に α インテグリンと結合するRGDモチーフを含む配列TS (GRGDTF)₃SSやラミニンリセプターと結合するモチーフ配列TS (GYIGSR)₃SSを同様に挿入したベクターおよびその組換えアデノウイルスを作製したが、それぞれ予想されるリセプターに対する特異的結合が見られなかったと報告している〔Wickham et al. J., Virol., 71 (11), 8221-8229 (1997)〕。

上記従来技術とは異なり、本発明のウイルスベクターでは悪性黒色腫に対して通常期待される以上の格段に優れた結果が得られた。

本発明者は、MSH受容体が多く黒色腫細胞で発現している〔Siegrist et al.,

Cancer Res., 49, 6352 (1989)] ことと、リガンドであるMSHがMSH受容体に高いアフィニティーで特異的に結合することを利用して、悪性黒色腫細胞に効率よく感染し遺伝子導入できるベクターを完成させた。本発明のベクターは悪性黒色腫だけでなく、MSH受容体を発現している他の腫瘍にも有効である。

本発明は、以下の(1)～(26)に関する。

- (1) ウイルスを構成するタンパク質に、MSH受容体に特異的に結合するリガンドを融合させてなるウイルスベクター。
- (2) ウイルスを構成するタンパク質が、リンカーを介してMSH受容体に特異的に結合するリガンドに融合している(1)記載のウイルスベクター。
- (3) リンカーがオリゴペプチドである(2)記載のウイルスベクター。
- (4) リンカーが配列番号25、27、29および31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する(3)記載のウイルスベクター。
- (5) ウイルスを構成するタンパク質が、ウイルスの外表面を構成するタンパク質である(1)～(4)のいずれか1つに記載のウイルスベクター。
- (6) リガンドが、 α -MSH、 β -MSH、 γ -MSHおよびこれらのいずれかの誘導体からなる群より選ばれるリガンドである(1)～(5)のいずれか1つに記載のウイルスベクター。
- (7) ウイルスが、アデノウイルス科、レトロウイルス科、パルボウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、パポバウイルス科、ヘパドナウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、オルソミクソウイルス科、バンヤウイルス科、アレナウイルス科およびレオウイルス科よりなる群のいずれかの科に属するウイルスから選ばれる(1)～(6)のいずれか1つに記載のウイルスベクター。
- (8) ウイルスがヒトアデノウイルスである(1)～(6)のいずれか1つに記載のウイルスベクター。
- (9) ウイルスが外来の遺伝子を含むウイルスである(1)～(8)のいずれか1つに

記載のウイルスベクター。

(10) 遺伝子が、非毒性のプロドラッグを細胞毒性を有する薬剤に変換することができる酵素をコードする遺伝子である(9)記載のウイルスベクター。

(11) 遺伝子が、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-tk) またはシトシン・デアミナーゼ (Cytosine deaminase, CD) をコードする遺伝子である(10)記載のウイルスベクター。

(12) 遺伝子が、直接または間接的に細胞毒性作用を有する分子をコードする遺伝子である(9)記載のウイルスベクター。

(13) 遺伝子が、サイトカイン、細胞増殖因子または細胞増殖抑制因子をコードする遺伝子である(12)記載のウイルスベクター。

(14) 遺伝子が、腫瘍抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子または細胞死調節遺伝子である(12)記載のウイルスベクター。

(15) 外来の遺伝子が、アデノウイルスE1AないしE1B の野生型または変異型の遺伝子または該遺伝子の一部である(9)記載のウイルスベクター。

(16) (1)～(15)のいずれか1つに記載のウイルスベクターを含有してなる医薬。

(17) (1)～(15)のいずれか1つに記載のウイルスベクターを含有してなる抗腫瘍剤。

(18) 腫瘍が悪性黒色腫である(17)記載の抗腫瘍剤。

(19) (1)～(15)のいずれか1つに記載のウイルスベクターを含有してなる腫瘍の診断薬。

(20) 腫瘍が悪性黒色腫である(19)記載の診断薬。

(21) 配列番号25、27、29および31のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を有するリンカー。

(22) (21)記載のリンカーをコードするDNA。

(23) 配列番号24、26、28および30のいずれか1つに示される塩基配列からなるDNA。

(24) 配列番号 32～39 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(25) (24) 記載のウイルスベクターをコードする DNA。

(26) 配列番号 7、13、17、18、20、21、22 および 23 のいずれか 1 つに示される塩基配列からなる DNA。

本発明のウイルスベクターとしては、アデノウイルス科、レトロウイルス科、パルボウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、パポーバウイルス科、ヘパドナウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、オルソミクソウイルス科、バンヤウイルス科、アレナウイルス科およびレオウイルス科よりなる群のいずれかの科に属するウイルスおよびこれらのウイルスより由来するベクター、アデノウイルスドデカヘドロンベクター (Fender et al., *Nature Biotech.* 15: 52-56 (1997))、ウイルスをリポゾームに組み合わせたベクター (例えば、センドライウイルスとリポゾームベクター等) 等を用いることができ、ヒトアデノウイルスが好ましく用いられる。

本発明のウイルスベクターの作製は、ウイルスを構成するタンパク質をコードする DNA に対し、一般的な組み換え DNA 作成技術 (Sambrook et al. 編, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. など参照) を用いて該タンパク質と MSH リガンドとの融合タンパク質をコードするように該当するウイルスタンパク質のコード領域を入れかえることによって行なえる。組換えウイルスの作成、あるいはリポゾームとの複合体などの作成については既存の方法に準じて行うことができる。既存の方法として、例えば、以下のような文献に記載の方法を挙げることができる。

Wolff ed., *Gene therapeutics: Methods and applications of direct gene transfer*. Birkhaeuser, Boston, 1994; Kaplitt and Loewy eds., *Viral v*

ectors: Gene therapy and neuroscience applications. Academic Press, San Diego, 1995; Liu et al. eds., DNA vaccines: A new era in vaccinology. Annals of the New York Academy of Sciences vol. 772. The New York Academy of Sciences, New York, 1995; Gluzman and Hughes eds., Viral vectors: Current communications in molecular biology Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988; Roth ed., Methods in cell biology: vol. 43. Protein expression in animal cells. Academic Press, San Diego 1994.

本発明に用いられるウイルスを構成するタンパク質として、例えば、ウイルスの外表面を構成するタンパク質を挙げることができる。外表面を構成するタンパク質としては、VSV (vesicular stomatitis virus) のGタンパク質、レトロウイルスのエンベロープタンパク質 (env)、アデノウイルスのキャプシドタンパク質 (ヘキソン、ペントンベース、ファイバー)、インフルエンザウイルスのHemagglutinin、パラミクソウイルスの表面糖タンパク質などが挙げられるが、癌細胞などの宿主細胞の表面への吸着や特異的受容体との相互作用を担うようなウイルスタンパク質であれば、いずれも本発明に用いられる。

本発明に用いられるMSH受容体に特異的に結合するリガンドとしては、 α -MSH、 β -MSH、 γ -MSH等が挙げられる。またこれらの変異体 (誘導体やランダムペプチドからスクリーニングしたものなど) を作成して、天然のMSHよりも一層MSH受容体との結合力の強いものを人工的に作成することも可能である。本発明に用いられるリガンドは、これら全てのMSHないしMSH様のリガンドを包含する。

以下の説明においては、MSH受容体に特異的に結合するリガンドをMSHと略記するが、本発明においては、MSH受容体と強い親和力を有する全てのリガンドも同様に用いることができる。

MSHとウイルスタンパク質とは、直接融合させることもできるが、リンカーペプチドを介して融合させることもできる。リンカーペプチドについては、長さは1から100残基程度までのオリゴペプチドが用いられる。当該オリゴペプチドの配

列としては、文献上報告された特定のペプチド配列でも、未報告のペプチド配列でも、MSH機能を保持しながらウイルスタンパク質とMSHとを結びつけるような役割を果たすペプチドであれば、MSHのC末端、内部あるいはN末端のどちらについているか、長さ、配列などは問わず、いずれでも本発明に用いることができる。

MSHとウイルスを構成するタンパク質とを融合させる位置は、当該タンパク質のC末端、内部またはN末端であっても、いずれの位置であってもよい。例えば、アデノウイルスのファイバータンパク質のようなウイルスを構成するタンパク質のC末端に配列番号25、27、29および31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するオリゴペプチドを介してMSHのN末端を結合させて融合させることができる。当該配列番号25、27、29および31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するリンカーペプチドおよび当該ペプチドをコードするDNAも本発明に包含される。

本発明のペプチドリナーを介してMSHを融合させたウイルスベクターを構成するタンパク質の具体例としては、配列番号32～39のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するタンパク質等が挙げられる。当該タンパク質をコードするDNAも本発明に包含される。具体的には、配列番号7、13および17～23のいずれかに示される塩基配列からなるDNA等が挙げられる。

本発明のウイルスベクターに外来の遺伝子を組み込むことにより、当該遺伝子を効率的に標的細胞に導入することができる。当該外来遺伝子を含むウイルスベクターも本発明に包含される。例えば、外来遺伝子として、直接的または間接的に標的細胞に対して細胞毒性作用を有するような分子をコードする遺伝子を組み込むことにより、癌細胞等の標的細胞を効率的かつ選択的に殺すことができる。このような遺伝子としては、例えば、サイトカイン、細胞増殖因子および細胞増殖抑制因子等をコードする遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子、細胞死調節遺伝子等が挙げられる。

また、外来遺伝子として、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-tk)、シトシン・デアミナーゼ (Cytosine deaminase, CD) 等の非毒性のプロドラッグを細胞毒性を有する薬剤に変換することができる酵素をコードする遺伝子を組み込むことにより、標的細胞を当該プロドラッグに対して感受性 (sensitive) にすることができる。例えば、HSV-tk をコードする遺伝子を組み込んだ場合は、標的細胞をガンシクロビルまたはアシクロビルに対して感受性にする事ができ、CD をコードする遺伝子を組み込んだ場合は、標的細胞内で非毒性の 5-フルオロシトシンを細胞毒性を有する薬剤である 5-フルオロウラシルに変換させることができる。

また、外来の遺伝子としては、例えば、アデノウイルス E1A ないし E1B の野生型または変異型の遺伝子が挙げられるが、該遺伝子の一部を含んでいるものであってもよい。

本発明のウイルスベクターは、医薬、例えば、悪性黒色腫等の MSH を発現している腫瘍の治療薬、特に悪性黒色腫の治療薬として用いることができる。

本発明のウイルスベクターを含有する医薬は、治療薬として該ベクター単独で投与することも可能ではあるが、通常は該ベクターを薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、通常は非経口経路、例えば皮下、筋肉内、静脈内、気道内等の投与経路が用いられる。

本発明のベクターを含有する治療薬は、治療薬として該ベクター単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該ベクターそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該ベクターを微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該ベクターおよび用いる担体の性質により、エア

ロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重、ウイルスベクターの種類等により異なるが、通常成人1回当たりウイルスベクターとして $10^3 \sim 10^{15}$ 個である。

本発明のウイルスベクターは、診断薬、例えば、悪性黒色腫等のMSHを発現している腫瘍の診断薬、特に悪性黒色腫の診断薬として用いることができる。例えば、本発明のウイルスベクターに標識となる遺伝子を組み込むことにより、悪性黒色腫等のMSHを発現している腫瘍を特異的に検出することができる。

図面の簡単な説明

第1図 293細胞に対し、野生型アデノウイルスAd5dIX-F/wtおよびF/MSH変異型アデノウイルスAd5-F/MSHを感染させ4日間培養後の細胞形態を示す図である。Aはコントロールの擬似感染(mock)、Bは野生型アデノウイルスAd5dIX-F/wt、CはF/MSH変異型アデノウイルスAd5-F/MSHを感染させたものをそれぞれ示す。

第2図 A375細胞に対し、野生型アデノウイルスAd5dIX-F/wtを感染させ4日間培養後の細胞形態を示す図である。Dはコントロールの擬似感染(mock)、EとFは野生型アデノウイルスAd5dIX-F/wtをそれぞれMOI10、30で感染させたものをそれぞれ示す。

第3図 A375細胞に対し、F/MSH変異型アデノウイルスAd5-F/MSHを感染させ4日間培養後の細胞形態を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、ウイルスベクターとしてヒト5型のアデノウイルス(Ad5)を、MSHと融合させるウイルスを構成するタンパク質としてAd5のファイバーを用いて、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1 MSH融合ファイバー変異型(F/MSH)の変異を持つヒト5型アデノウ

イルス（以下、Ad5-F/MSHと略記する）の作成

a) F/MSH変異をコードするプラスミドの作成：

野生型のファイバーをコードする遺伝子領域の3'末端に11アミノ酸よりなるリンカーと13アミノ酸よりなるヒト α -MSHをコードする塩基配列（配列番号1）を、合成オリゴヌクレオチドNo. 924（126mer、配列番号2）をテンプレートとし、No. 933（配列番号3）とNo. 934（配列番号4）をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応法（polymerase chain reaction、PCR）によって合成した。

このPCR産物をEcoRIで切って、pBluescript SKII+（ストラタジーン社）のEcoRIサイトへクローニングしてpSKII+nbMSHを得た（Yoshida et al., 1998）。さらに、pSKII+nbH（Yoshida et al., 1998）のHindIII / XhoI断片とpSKII+nbMSHのXhoI / MunI断片を、pSKII+[X-K]（Yoshida et al., 1998）のHindIII / MunIサイトへクローニングしてプラスミドpSKII+[X-K]nbMSHを得た。さらにpSKII+[X-K]nbMSHのNheI / KpnI断片（2.1 kbp）をpSKII +6.7Rnp（Yoshida et al., 1998）のNheI / KpnIサイトへサブクローニングして、pSKII+6.7R-MSHを得た。pSKII+6.7R-MSHからEcoRI / PacI断片を切り出してpTR（Yoshida et al., 1998）のEcoRI / PacIサイトへクローニングしてpTR-MSHを得た。F/MSH変異型のファイバーのC末端の予想アミノ酸配列は以下になる。ただし、数字は5型アデノウイルス（Ad5）のファイバーのN末端を1として数えたアミノ酸残基の位置を示す。

S₅₇₁SYTFSYIAQE₅₈₁PSASASASAPG₅₉₂SYSMEHFRWGKPV₆₀₅

581までが本来のAd5ファイバーのアミノ酸配列、582から592までの11残基がリンカーのアミノ酸配列、593から605までの13残基がヒト α -MSHのアミノ酸配列である。

pTR-MSHを含む大腸菌である*Escherichia coli* DH5 α /pTR-MSHは、平成11年2月22日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）にFERM BP-6656として寄託されている。

b) F/MSH変異型組み換えアデノウイルスの作成

F/MSHを有する組み換えアデノウイルスは、公知の方法 (Yoshida et al., 1998) に準じて作成した。すなわち、アデノウイルスAd5dlX [Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 1320-1324 (1996)] からゲノムDNA-末端タンパク質複合体 (以下、DNA-TPCと略記する) を分離し、これをEcoRIとAseIで切断したものと、pTR-MSHのプラスミドDNAをPacIで切断したものとを、293細胞へ共トランスフェクションした。Yoshida et al., 1998にF/K20変異体の作成法として記載した方法と本質的に同じ方法を用いた。ただし従来通りの方法 [Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 1320-1324 (1996)] に従って共トランスフェクションを行ったところ、繰り返して実験を行ったにもかかわらず、プラークは1つも得られなかった (Yoshida et al., 1998)。本実施例では、得られたAdv-F/MSH変異体のウイルスタイターがきわめて低いために、従来通りのウイルスプラーク作成法を用いてはウイルスの分離は困難と考えた。そこで本発明者は、DNAをトランスフェクトされた293細胞の96ウエルプレートへのまき込み数を従来法の30%とし、培養液のウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS) の濃度を従来の10%からその半分の5%へと低くし、培養液をトランスフェクションから4日目、8日目、15日目の3回、それぞれ1ウエルに50 μ lずつ適宜追加しながら3週間にわたって培養を続けたところ、ようやく全体で2クローンのプラークを分離することができた。これらのウイルスを293細胞ならびにA375ヒト悪性黒色腫細胞に感染させて増幅させてから生物活性の検討を行った。得られたAd5-F/MSHのウイルス液のタイターは通常の293を用いたプラークアッセイ法では検出限界以下であった (10^5 pfu/ml以下)。

c) F/MSHファイバー変異型アデノウイルスの293細胞ならびにA375ヒト悪性黒色腫細胞に対する感染によって起こる細胞毒性の検討

293細胞またはA375細胞を6ウエルプレートにまき、翌日コントロールの擬似感染 (mock infection)、野生型 (wt) アデノウイルスAd5dlX-F/wtの感染、な

らびに、F/MSH変異型アデノウイルス (Ad5-F/MSH) の感染を行い、96時間後の細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。第1図のAにコントロールの293細胞、B、CにそれぞれF/wtとF/MSHのAd5dIXアデノウイルスに感染した293細胞を示す。4日間の培養でBのF/wtの感染した293細胞はほとんど100%の細胞が死んで丸く浮き上がってくる。一方、CのF/MSHの感染した293細胞では細胞のダメージはほとんど見られずコントロール (A) とほぼ同等の形態を示した。

第2図のDにコントロールのA375細胞、E、Fが野生型ファイバー (F/wt) のAd5dIXアデノウイルスをそれぞれMOI10、30で感染させたA375の形態を示す。4日間の培養で、293細胞の結果とは対照的に、F/wtの感染したA375細胞では、十分な細胞毒性は得られていない (第2図のE、F)。一方、第3図のGはF/MSH変異型ファイバーを有するAd5dIXアデノウイルス (Ad5-F/MSH) を感染させたA375細胞の形態を示す。4日間の培養で非常に強い細胞毒性が得られることがわかる。

以上の結果から、F/MSHファイバー変異型アデノウイルスは、293細胞に比し、A375ヒト悪性黒色腫細胞に対して効率良く、しかも選択性も優れた遺伝子導入の可能なベクターとして有用であることが示された。

実施例2 MSH融合型の変異ファイバーを持つヒト5型アデノウイルスの改良型 (Ad5-F/asMSHa) の作成

実施例1の方法では、F/MSH変異型アデノウイルスの悪性黒色腫細胞に対する顕著な効果、すなわち、高効率の遺伝子導入と強い細胞毒性効果は示されたものの、得られたウイルス液のタイターが低い (10^5 pfu/ml以下) のでこれを改善する必要がある。そこで、以下に述べるようなファイバー変異型アデノウイルス作成方法を用いることによって、 10^7 から 10^8 pfu/ml 以上の実用上十分に高いタイターを有するMSH融合ファイバー変異アデノウイルスを得ることができた。

a) F/asMSHaファイバー変異をコードするDNA断片の作成

α -MSHのコード領域とファイバーのポリAシグナル領域は、新しく合成したオ

リボヌクレオチドプライマーのNo. 1061（配列番号 5）とNo. 1092（配列番号 6）を用いて、実施例1のpSKII+6. 7R-MSHをテンプレートとしてPCR法によって合成した。

PCR産物をBamHI/EcoRIで切断して、pNEB193（NEB社）のBamHI/EcoRIサイトへクローニングし、塩基配列を確認した。

b) コスミドpWE6. 7R-F/asMSHaの作成

コスミドpWE15（GenBank accession, M99569）はClontech社（Palo Alto, CA, USA）から購入した。pSKII+6. 7R-K20〔Yoshida et al., Hum. Gene Ther. 9:2503-2515（1998）の2506ページに記載されている〕のSacIIサイトをT4DNAポリメラーゼで平滑化して、ここに新たに合成したリン酸化BstBIリンカー（pdGCTTCGAAGC）を挿入した。これからAd5アデノウイルスのゲノムを含むEcoRI/BstBI断片を切り出し、pWE15のEcoRI/ClaIサイトにクローニングしてpWE6. 7R-F/K20を得た。これからK20変異をコードする配列を含むBamHI/KpnI断片をa) で述べたNo. 1061-No. 1092 PCR産物のBamHI/KpnI断片に入れかえることによってpWE6. 7R-F/asMSHaを得た。このときファイバーをコードする領域の塩基配列（Ad5-F/asMSHa. seq）およびコードするアミノ酸配列を配列番号7に示した。

c) コスミドpWEAxKM-F/asMSHaの作成

ファルマシア社から購入したプラスミドpUC-4Kからカナマイシン耐性遺伝子を含むBamHI切断断片（1264bp）を切り出し、T4DNAポリメラーゼで末端を平滑化して、pAx-cw〔Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1320-1324（1996）〕のSwaIサイトにクローニングしてpAxKMを得た。これのAd5のゲノムを含むEcoRI断片（約25773bp）を、b) で述べたpWE6. 7R-F/asMSHaのEcoRIサイトにクローニングして、Ad5のゲノムが正しい方向につながっているものを選択することにより、全長約40702bpのコスミドpWEAxKM-F/asMSHaを得た。

d) F/asMSHa変異型組み換えアデノウイルスの作成

アデノウイルスAd5d1XのDNA-TPCをEcoRIとAseIで切断したものと、pWEAxKM-F/asMSHaをClaIとPacIで切断したものとを、293細胞へ共トランスフェクションした。実施例1で述べたような細胞培養での工夫をする必要なく、従来通りの培養方法で、多数のプラークを分離することができ、ウイルスゲノムの解析結果からも、予想通りのF/asMSHa変異をもったAd5d1Xの変異株であることが確認された。実施例1で述べたウイルスと区別するためこれをAd5-F/asMSHaと名付けた。Ad5-F/asMSHaウイルスのストック液のタイターは 1.10×10^8 pfu/mlと、実用上十分に高いタイターが得られた。

実施例3 レポーターlacZ遺伝子を発現するF/asMSHaファイバー変異型組み換えアデノウイルスAxCAZ3-F/asMSHaの作成

E1A領域に各種外来性遺伝子の発現カセットを組み込んだF/asMSHaファイバー変異型アデノウイルス作成が可能なことを示すため、まずレポーターとして大腸菌lacZ遺伝子を発現する組み換え体の作成を試みた。

Yoshida et al., 1998に記載されたpCAZ2からlacZを含むAseI断片（末端平滑化）約4889bpを、プロメガ社（Madison, WI, USA）から購入したpCIプラスミドのBglII/SalI（末端平滑化）サイトへクローニングしてpCAZ3を得た。これからBglII/BamHI断片（末端平滑化）約5153bpを切り出し、コスミドpAx-cw（Miyake et al., 1996）のSwaIサイトにクローニングしてpAxCAZ3を得た。このコスミドDNAと、Ad5d1XのDNA-TPCを用いて野生型ファイバー（F/wt）の組み換えアデノウイルスAxCAZ3-F/wtを得た。これからさらにDNA-TPCを調製し、これをEcoRIとAseIで切断したものと、実施例2で得られたWEAxKM-F/asMSHaコスミドDNAをClaIとPacIで切断したものとを、293細胞へ共トランスフェクションした。従来通りの培養法で多数のプラークを分離することができ、ウイルスゲノムの解析結果からも、予想通りのF/asMSHa変異をもち、なおかつ、E1A領域にレポーターlacZ発現カセットをもつ組換えアデノウイルスであることが確認された。この組換えウイルスをAxCAZ3-F/asMSHaと名付けた。

実施例4 MSH受容体（以下、MSHRと略記する）を高発現する宿主細胞を用いた、F/asMSHa変異型アデノウイルスの作成

a) MSHRを発現するレトロウイルスベクターの作成

ヒトのメラノーマ細胞A375の粗RNAから得たcDNAをテンプレートとし、MSHRをコードする領域のN末側半分をプライマーNo. 1037（配列番号8）とNo. 1040（配列番号11）、C末側半分をプライマーNo. 1038（配列番号9）とNo. 1039（配列番号10）を用いて増幅（RT-PCR法）し、MSHRのcDNA断片を得た。それぞれのDNA断片をEcoRI/KpnIで切断して、pBluescriptISK+のEcoRI/KpnIサイトにクローニングしたのち塩基配列を確認した。これから、N末側をEcoRI/KpnI、C末側をKpnI/NotIでそれぞれ切り出して、レトロウイルス作成用のプラスミドのpRx-bsr [Shinoura et al., Human Gene Ther. 9:1983-1993 (1998)] のEcoRI/NotIサイトへ3パート・ライゲーションでクローニングしてプラスミドpRxhMSHRを得た。このプラスミドを用いて文献（濱田洋文ら、レトロウイルスベクター 日本遺伝子治療学会編集：遺伝子治療開発研究ハンドブック 第3章 導入技術、印刷中、エヌ・ティー・エス、1999）に記載の方法を用いてMSH発現レトロウイルス産生細胞のψCRIP/MSHRを樹立した。

b) MSHRを高発現する293宿主細胞由来の細胞株の作成

ψCRIP/MSHRの培養上清中のレトロウイルスを293細胞に感染させることによりMSHRを高発現する293/MSHR細胞株を得た。

c) 293/MSHRを用いたF/asMSHa変異型アデノウイルスの増幅

通常のアデノウイルス作成の宿主として用いる293細胞の代わりに、293/MSHR細胞を用いてF/asMSHa変異型アデノウイルスのタイターをプラークアッセイ法で測定すると、同一の液をアッセイしているにもかかわらず、293細胞で得られるタイター値に比べて3から10倍高い見かけ上のタイター値が得られた。これは、293細胞を使った場合に比べて293/MSHR細胞を使えばF/asMSHa変異型アデノウイルスの感染効率ならびにプラーク形成率が高まるためと考えられる。つまり、

293/MSHR細胞を宿主として用いれば、293細胞を使う場合よりもさらに高いタイターのウイルス液を調製できると考えられる。

実施例5 β -MSH融合ファイバー変異型の組換えアデノウイルスの作成

実施例1から4までは、ヒト α -MSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成例を示した。さらに、 α -MSH以外のリガンドに関しても悪性黒色腫細胞の治療に有用なファイバー変異型ウイルスを作成することが可能かどうかを、 β -MSHをリガンドの一例として用いて検討した。

a) β -MSH融合ファイバータンパク質をコードするプラスミドDNAの作成

β -MSHをコードするPCR用のプライマーNo. 1075を新しく作成した（配列番号12） No. 1075とNo. 1092（実施例2に記載）をプライマーとして、pSKII+6.7RnpをテンプレートとしてPCRを行い、得られたPCR産物をBamHIとEcoRIで切断して、pNEB193のBamHI/EcoRIサイトにクローニングした後、塩基配列を確認した。 β -MSHをコードするDNA断片をBamHI/KpnIで切り出し、実施例2で得られたpWE6.7R-F/asMSHaのBamHI/KpnIサイトにクローニングしてpWE6.7R-F/asMSHbを得た。さらにこのEcoRIサイトに、pAxKMのEcoRI断片（約25kbp）を順方向にクローニングして、pWEAxKM-F/asMSHbコスミドDNAを得た。

b) β -MSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

実施例2と同様の方法で、Ad5dIXのDNA-TPCとpWEAxKM-F/asMSHbのDNAを293細胞に共トランスフェクトすることにより、 β -MSH融合ファイバー変異型アデノウイルスAd5-F/asMSHbを作成した。多くのプラークが得られ、ウイルスゲノムの解析からも、目的としたF/asMSHb変異ウイルスが得られたことが確認された。

さらに実施例3と同様の方法で、AxCAZ3-F/wtのDNA-TPCとpWEAxKM-F/asMSHbのDNAを293細胞に共トランスフェクトすることにより、大腸菌lacZレポーター遺伝子発現カセットを持ち、なおかつ、 β -MSH融合ファイバー変異型の組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/asMSHbを作成した。F/asMSHb変異型のファイバーのDNA配列を配列番号13に示した。

実施例6 GSリンカーを持つMSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

実施例1から5までは、アデノウイルスのファイバータンパク質のC末端にASリンカー (PSASASASAPG 配列番号25) をはさんで α -MSHないし β -MSHのリガンドのアミノ酸配列が続く構造 (β -MSHのリガンドの場合のASリンカーは、C末端にさらにセリン残基が付加されている) をもつ変異型アデノウイルスの作成例を示した。さらにASリンカー以外のリンカーに関しても、悪性黒色腫細胞の治療に有用なファイバー変異型ウイルスを作成することが可能かどうかを、GSリンカー (GSGSGSGSGSG 配列番号27; β -MSHのリガンドの場合は、C末端にさらにセリン残基が付加されている) を一つの例として用いて検討した。

a) GSリンカーをコードするプラスミドDNAの作成

GSリンカーをコードするプライマーNo. 1060 (61mer 配列番号14) を新たに合成した。さらにPCR反応を容易にするために、No. 1060よりも短くコドンの使用も少し異なるプライマーNo. 1098 (41mer 配列番号15) を新たに合成した。pSKI1+6. 7R-K20をテンプレートとしてさらにNo. 931 (Yoshida et al., 1998に記載 配列番号16) とNo. 1060でPCR反応を行い、そのPCR産物をテンプレートとしてさらにNo. 931とNo. 1098でPCR反応を行った。

このPCR産物をHindIII/BamHIで切断してpNEB193にクローニングして、塩基配列を確認した。次にpWE6. 7R-F/asMSHaとpWE6. 7R-F/asMSHbのASリンカーを含むXhoI/BamHIのDNA断片を、GSリンカーを含むXhoI/BamHI DNA断片にそれぞれ入れ替えることにより、pWE6. 7R-F/gsMSHaとpWE6. 7R-F/gsMSHbを得た。それぞれのコスミドDNAのEcoRIサイトにpAxKMからのEcoRI断片 (約25kbp) を順方向でクローニングすることにより、それぞれpWEAxKM-F/gsMSHaとpWEAxKM-F/gsMSHbを得た。

b) GSリンカーを有するMSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

a) で作成したコスミドを、Ad5dlXないしAxCAZ3-F/wt由来のDNA-TPCと共トラ

ンスフェクトすることにより、GSリンカーを有するMSH融合ファイバー変異型アデノウイルス4種を樹立できた。すなわち、Ad5-F/gsMSHa, Ad5-F/gsMSHb, AxCAZ3-F/gsMSHa, ならびにAxCAZ3-F/gsMSHbである。以上の4種は、ウイルスゲノムの解析結果からも、目的とする変異型アデノウイルスであることが確認された。F/gsMSHaとF/gsMSHbのファイバーをコードする塩基配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号17、18に示した。

実施例7 K21リンカーを持つMSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

実施例1から6までは、ASリンカーないしGSリンカーのような11~12アミノ酸程度の比較的短いリンカー配列を有する変異型アデノウイルスの作成例を示したが、さらに多数のアミノ酸配列を有するリンカーに関しても悪性黒色腫細胞の治療に有用なファイバー変異型ウイルスを作成することが可能かどうかを、ASリンカー（11アミノ酸）またはGSリンカー（11アミノ酸）に25残基のアミノ酸配列（計37アミノ酸）を加えたリンカーであるasK21リンカー（配列番号29）とgsK21リンカー（配列番号31）を例として用いて検討した。

a) asK21リンカーならびにgsK21リンカーをコードするプラスミドDNAの作成

K21リンカーをコードするプライマーNo. 1089 (128mer 配列番号19) を新たに合成した。No. 1089とNo. 1092のプライマーを用いてpSKII+6.7RnpをテンプレートにしてPCR反応を行い、PCR産物をEcoRIサイトにクローニングし、塩基配列を確認した。これのK21リンカーをコードする領域であるBglIIIからBamHIまでのDNA断片をpWE6.7R-F/asMSHa, pWE6.7R-F/gsMSHa, pWE6.7R-F/asMSHb, pWE6.7R-F/gsMSHbのBamHIサイトへ挿入することによって、それぞれpWE6.7R-F/asK21MSHa, pWE6.7R-F/gsK21MSHa, pWE6.7R-F/asK21MSHb, pWE6.7R-F/gsK21MSHbのコスミドDNAを得た。これらのK21リンカーを含むファイバーをコードするコスミドのEcoRIサイトに、pAxKMのEcoRI断片（約25kbp）を順方向でクローニングすることにより、それぞれpWEAxKM-F/asK21MSHa, pWEAxKM-F/gsK21MSHa,

pWEA_xKM-F/asK21MSHb, pWEA_xKM-F/gsK21MSHbのコスミドDNAを得た。

b) asK21リンカーならびにgsK21リンカーを有するMSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

a)で作成したコスミドDNAを、Ad5d1XのDNA-TPCと共トランスフェクトすることにより、それぞれAd5-F/asK21MSHa, Ad5-F/gsK21MSHa, Ad5-F/asK21MSHb, Ad5-F/gsK21MSHbのアデノウイルスを樹立することができた。Ad5-F/asK21MSHa, Ad5-F/gsK21MSHa, Ad5-F/asK21MSHb, Ad5-F/gsK21MSHbのファイバーをコードする領域のDNA配列およびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号20、21、22、23に示した。また同様にして、AxCAZ3-F/wtのDNA-TPCと共トランスフェクトすることにより、それぞれ、AxCAZ3-F/asK21MSHa, AxCAZ3-F/gsK21MSHa, AxCAZ3-F/asK21MSHb, AxCAZ3-F/asK21MSHbのアデノウイルスを樹立することができた。以上の8種は、ウイルスゲノムの解析結果からも、目的とするファイバー変異型アデノウイルスであることが確認された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ウイルスを構成しているタンパク質にMSH受容体に特異的に結合するリガンドを融合させてなるウイルスベクター、および該ベクターを用いた悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対する診断薬および治療薬を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号1：5型アデノウイルスのファイバーの一部、ASリンカーペプチドおよび α -MSHをコードするDNA

配列番号2：配列番号1のDNAをPCRで増幅させるためのテンプレートとして使用する合成DNA No. 924

配列番号3：配列番号1のDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 933

配列番号4：配列番号1のDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマ

ーとして使用する合成DNA No. 934

配列番号 5 : α -MSHおよびアデノウイルスのファイバーのポリ A シグナルをコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1061

配列番号 6 : α -MSHおよびアデノウイルスのファイバーのポリ A シグナルをコードするDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1092

配列番号 7 : pWE6. 7R-F/asMSHaの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 8 : ヒトMSH受容体の1-154残基をコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1037

配列番号 9 : ヒトMSH受容体の150-317残基をコードするDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1038

配列番号 10 : ヒトMSH受容体の150-317残基をコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1039

配列番号 11 : ヒトMSH受容体の1-154残基をコードするDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1040

配列番号 12 : β -MSHおよびアデノウイルスのファイバーのポリ A シグナルをコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1075

配列番号 13 : pWE6. 7R-F/asMSHbの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 14 : 5型アデノウイルスのファイバーの一部およびGSリンカーペプチドをコードするDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1060

配列番号 15 : 5型アデノウイルスのファイバーの一部およびGSリンカーペプチドをコードするDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして

使用する合成DNA No. 1098

配列番号 16 : 5型アデノウイルスのファイバーの一部およびGSリンカーペプチドをコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 931

配列番号 17 : pWE6. 7R-F/gsMSHaの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 18 : pWE6. 7R-F/gsMSHbの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 19 : K21リンカーをコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1089

配列番号 20 : pWE6. 7R-F/asK21MSHaの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 21 : pWE6. 7R-F/gsK21MSHaの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 22 : pWE6. 7R-F/asK21MSHbの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 23 : pWE6. 7R-F/gsK21MSHbの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号 24 : ASリンカーをコードするDNA

配列番号 25 : ASリンカーペプチド

配列番号 26 : GSリンカーをコードするDNA

配列番号 27 : GSリンカーペプチド

配列番号 28 : asK21リンカーをコードするDNA

配列番号 29 : asK21リンカーペプチド

配列番号 30 : gsK21リンカーをコードするDNA

配列番号 31 : gsK21リンカーペプチド

- 配列番号 3 2 : pWE6. 7R-F/asMSHaにコードされる変異型ファイバータンパク質
- 配列番号 3 3 : pWE6. 7R-F/asMSHbにコードされる変異型ファイバータンパク質
- 配列番号 3 4 : pWE6. 7R-F/gsMSHaにコードされる変異型ファイバータンパク質
- 配列番号 3 5 : pWE6. 7R-F/gsMSHbにコードされる変異型ファイバータンパク質
- 配列番号 3 6 : pWE6. 7R-F/asK21MSHaにコードされる変異型ファイバータンパク質
- 配列番号 3 7 : pWE6. 7R-F/gsK21MSHaにコードされる変異型ファイバータンパク質
- 配列番号 3 8 : pWE6. 7R-F/asK21MSHbにコードされる変異型ファイバータンパク質
- 配列番号 3 9 : pWE6. 7R-F/gsK21MSHbにコードされる変異型ファイバータンパク質

請求の範囲

1. ウイルスを構成するタンパク質に、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) 受容体に特異的に結合するリガンドを融合させてなるウイルスベクター。
2. ウイルスを構成するタンパク質が、リンカーを介してメラニン細胞刺激ホルモン (MSH) 受容体に特異的に結合するリガンドに融合している請求項 1 記載のウイルスベクター。
3. リンカーがオリゴペプチドである請求項 2 記載のウイルスベクター。
4. リンカーが配列番号 25、27、29 および 31 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を有する請求項 3 記載のウイルスベクター。
5. ウイルスを構成するタンパク質が、ウイルスの外表面を構成するタンパク質である請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。
6. リガンドが、 α -MSH、 β -MSH、 γ -MSH およびこれらのいずれか 1 項の誘導体からなる群より選ばれるリガンドである請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。
7. ウイルスが、アデノウイルス科、レトロウイルス科、パルボウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、パポーバウイルス科、ヘパドナウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、オルソミクソウイルス科、バンヤウイルス科、アレナウイルス科およびレオウイルス科よりなる群のいずれかの科に属するウイルスから選ばれる請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。
8. ウイルスがヒトアデノウイルスである請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。
9. ウイルスが外来の遺伝子を含むウイルスである請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクター。
10. 遺伝子が、非毒性のプロドラッグを細胞毒性を有する薬剤に変換する

ことができる酵素をコードする遺伝子である請求項 9 記載のウイルスベクター。

11. 遺伝子が、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-tk) またはシトシン・デアミナーゼ (Cytosine deaminase, CD) をコードする遺伝子である請求項 10 記載のウイルスベクター。

12. 遺伝子が、直接または間接的に細胞毒性作用を有する分子をコードする遺伝子である請求項 9 記載のウイルスベクター。

13. 遺伝子が、サイトカイン、細胞増殖因子または細胞増殖抑制因子をコードする遺伝子である請求項 12 記載のウイルスベクター。

14. 遺伝子が、腫瘍抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子または細胞死調節遺伝子である請求項 12 記載のウイルスベクター。

15. 外来の遺伝子が、アデノウイルス E1A ないし E1B の野生型または変異型の遺伝子または該遺伝子の一部である請求項 9 記載のウイルスベクター。

16. 請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含有してなる医薬。

17. 請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含有してなる抗腫瘍剤。

18. 腫瘍が悪性黒色腫である請求項 17 記載の抗腫瘍剤。

19. 請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載のウイルスベクターを含有してなる腫瘍の診断薬。

20. 腫瘍が悪性黒色腫である請求項 19 記載の診断薬。

21. 配列番号 25、27、29 および 31 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を有するリンカー。

22. 請求項 21 記載のリンカーをコードする DNA。

23. 配列番号 24、26、28 および 30 のいずれか 1 つに示される塩基配列からなる DNA。

24. 配列番号 32～39 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を有する

タンパク質。

25. 請求項 2 4 記載のタンパク質をコードする DNA。
26. 配列番号 7、13、17、18、20、21、22 および 23 のいずれか 1 つに示される塩基配列からなる DNA。

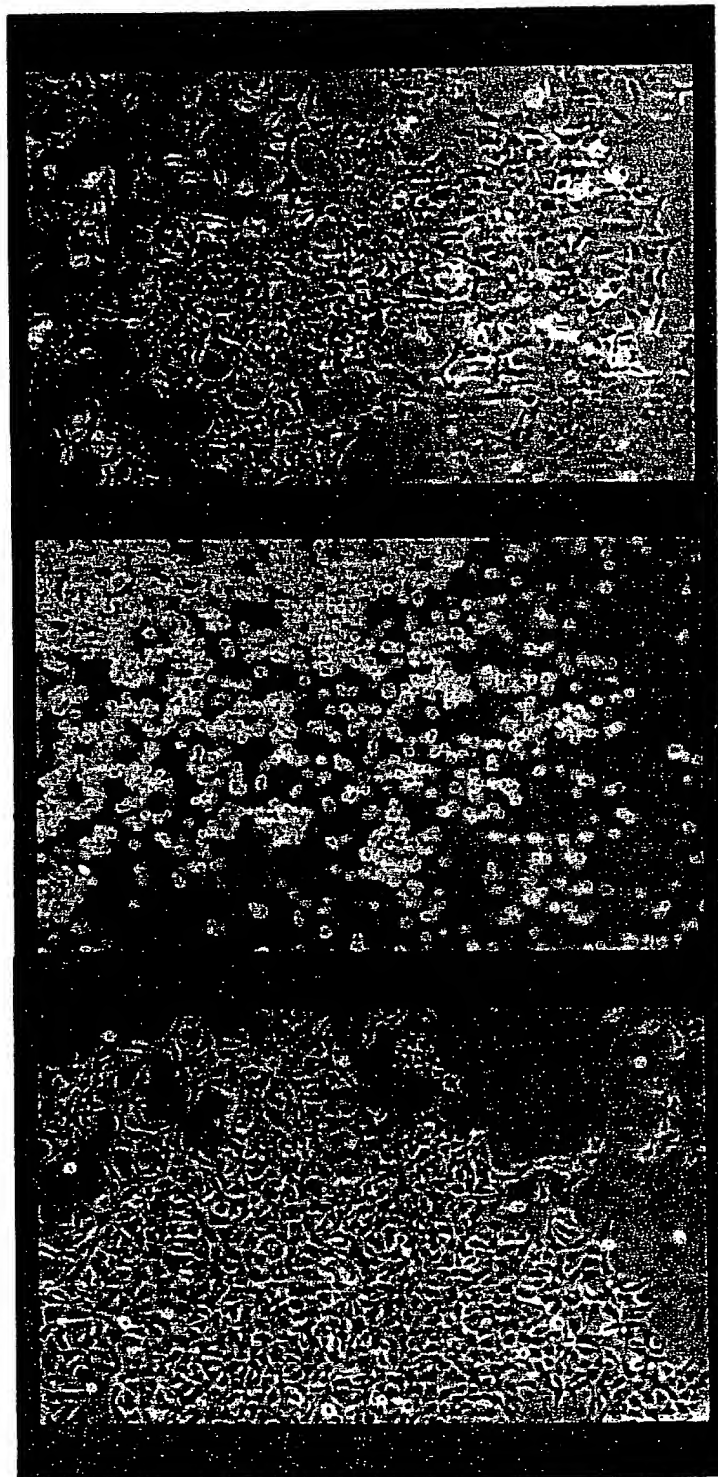


第 1 図

A 293 mock

B 293 Ad5-F/wt (MOI 10)

C 293 Ad5-F/MSH



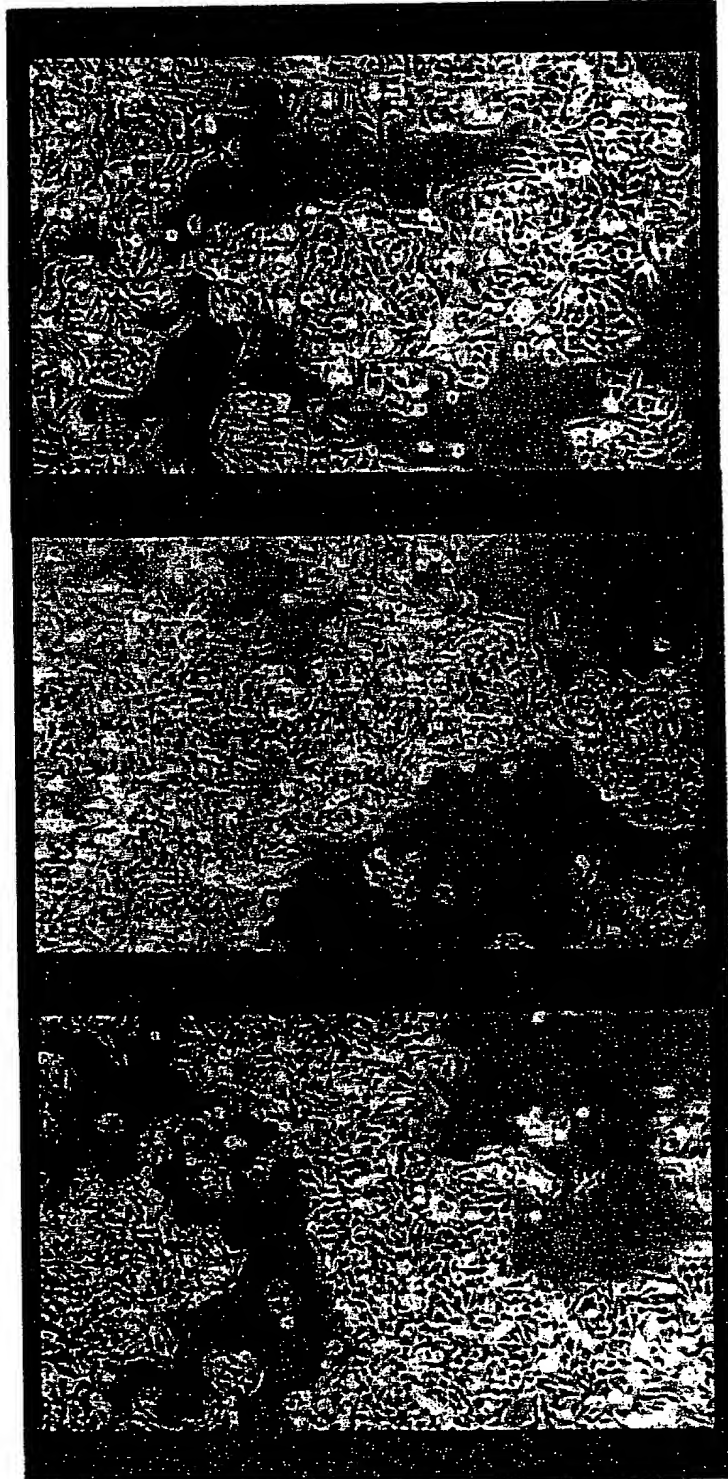


第 2 図

D A375 mock

E A375 Ad5-F/wt (MOI 10)

F A375 Ad5-F/wt (MOI 30)





第 3 図

G **A375**
Ad5-F/MSH





配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> Juridical Foundation, Japanese Foundation For Cancer Research

<120> vector for gene therapy of malignamt melanoma, with use of virus having MSH fused protein.

<130> H11-0241J2

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber, AS linker peptide and α -MSH.

<220>

<221> CDS

<222> (3).. (113)



<400> 1

gg gaa ttc tgc agt tac act ttt tca tac att gcc caa gaa cca tca 47

Glu Phe Ser Ser Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser

1 5 10 15

gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga tcc tac tcc atg gag cac ttc 95

Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe

20 25 30

cgc tgg ggc aag ccg gtg taaagaatcg ttgtgttat gtttcaacgt 143

Arg Trp Gly Lys Pro Val

35

gtttatTTTT caattgaatt ccc 166

<210> 2

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 924 used as template for PCR amplification of DNA
sequence No. 1.

<400> 2

cgttgaaaca taacacaaac gattctttac accggcttgc cccagcggaa gtgctccatg 60

gagtaggaac caggggcgga agcagatgcg gaggcgatg gtcttgggc aatgtatgaa 120

aaagtg 126



<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 933 used as sense primer for PCR amplification of DNA sequence No. 1.

<400> 3

gggaattctc gagttacact ttccataca ttgcccaag

39

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 934 used as antisense primer for PCR amplification of DNA sequence No. 1.

<400> 4

gggaattcaa ttgaaaaata aacacgttga aacataacac aaacgattc

49



<210> 5

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1061 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding α -MSH and adenovirus fiber poly A signal.

<400> 5

cgggataccta ctccatggag cacitccgct ggggcaagcc ggtgtaagtc gacaagaata 60
aagaatcggtt tgtgtt 76

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1092 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding α -MSH and adenovirus fiber poly A signal.

<400> 6

cggaattcat ggcgccatgt ttaatcagag gt 32



<210> 7

<211> 1818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/asMSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1815)

<400> 7

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45



ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc glg cac gac tcc aaa ctt agc att 432
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480



Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145 150 155 160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165 170 175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180 185 190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195 200 205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210 215 220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225 230 235 240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245 250 255



gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104



Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460



gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728



His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

tcc tac tcc atg gag cac ttc cgc tgg ggc aag ccg gtg taa 1818

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

595

600

605

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1037 used as sense primer for PCR amplification of
DNA coding human MSH receptor residue 1-154.

<400> 8

gggaattcac catggctgtg cagggatccc agagaagact

40

<210> 9



<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1038 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding human MSH receptor residue 150-317.

<400> 9

gggaattcac caggagcatg tcagcacctc ctt

33

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1039 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding human MSH receptor residue 150-317.

<400> 10

ctgcggtacc acagcatcgt gaccctg

27

<210> 11

<211> 27



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1040 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding human MSH receptor residue 1-154.

<400> 11

gctgtggtac cgcagtcgt agaagat

27

<210> 12

<211> 107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1075 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding β -MSH and adenovirus fiber poly A signal.

<400> 12

cgcggaatccg ccgagaagaa ggacgagggc ccctacagga tggagcactt ccgctggggc

60

agccccccca aggactaagt cgacaagaat aaagaatcgt ttgtgtt

107

<210> 13



<211> 1848

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6. 7R-F/asMSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<400> 13

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu



50 55 60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160



aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624
Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672
Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768
Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816
Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val



260	265	270	
agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864			
Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln			
275	280	285	
ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912			
Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn			
290	295	300	
aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960			
Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu			
305	310	315	320
gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008			
Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile			
325	330	335	
gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056			
Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro			
340	345	350	
aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104			
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp			
355	360	365	



tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe



465	470	475	480	
aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga				1488
Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly				
	485	490	495	
ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc				1536
Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala				
	500	505	510	
aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa				1584
Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys				
	515	520	525	
cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac				1632
Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp				
	530	535	540	
aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc				1680
Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly				
545	550	555	560	
cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca				1728
His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser				
	565	570	575	



tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

tcc gcc gag aag aag gac gag ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc 1824

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

595

600

605

tgg ggc agc ccg ccc aag gac taa

1848

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

610

615

<210> 14

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1060 used as antisense primer for PCR amplification
of DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber and GS linker peptide.

<400> 14

cgggatccag atccagaacc actaccactt ccagaaccit ctitgggcaat gtaatgaaaaa 60

g

61



<210> 15

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1098 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber and GS linker peptide.

<400> 15

cggtgtggatc cgctgccaga accactacca ctccagaac c

41

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 931 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber and GS linker peptide.

<400> 16

ggcctttact tgtttacagc

20



<210> 17

<211> 1818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6. 7R-F/gsMSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1815)

<400> 17

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192



Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160



aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

gcc tca ccc cct cia act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cia gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cia aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cia agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816



Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365



tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152
Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
370 375 380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
385 390 395 400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248
Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
405 410 415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
420 425 430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
435 440 445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392
Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
450 455 460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440



Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465 470 475 480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485 490 495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500 505 510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515 520 525

cct gia aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530 535 540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545 550 555 560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565 570 575



tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga 1776
Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
580 585 590

tcc tac tcc atg gag cac ttc cgc tgg ggc aag ccg gtg taa 1818
Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
595 600 605

<210> 18

<211> 1848

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6. 7R-F/gsMSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<400> 18

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48
Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15



tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96
Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144
Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384



Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220



ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768
Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816
Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864
Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912
Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
290 295 300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960
Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
305 310 315 320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008



Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430



ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

ccg gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632



Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

tcc gcc gag aag aag gac gag ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc 1824

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

595

600

605

tgg ggc agc ccg ccc aag gac taa

1848

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

610

615

<210> 19

<211> 128



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No. 1089 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding K21 linker peptide.

<400> 19

```
ccggaattca gatctggatc taagaagaag aagaagaaaa agaagaaaaa gaagaagaag      60
aaaaaaaaaga agaagaaaaa gaaaggatcc taagatatcg tcgacaagaa taaagaatcg      120
tttgtgtt                                     128
```

<210> 20

<211> 1893

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6. 7R-F/ask21MSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1890)

<400> 20



atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu



100	105	110	
act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384			
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr			
115	120	125	
atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432			
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile			
130	135	140	
gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480			
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln			
145	150	155	160
aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528			
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr			
165	170	175	
gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576			
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu			
180	185	190	
aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624			
Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly			
195	200	205	



gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu



305 310 315 320

ggt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008
Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056
Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152
Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248
Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415



aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys



515	520	525	
cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632			
Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp			
530	535	540	
aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680			
Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly			
545	550	555	560
cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728			
His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser			
565	570	575	
tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga 1776			
Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly			
580	585	590	
tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824			
Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys			
595	600	605	
aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc tac tcc atg gag cac ttc 1872			
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe			
610	615	620	



cgc tgg ggc aag ccg gtg taa

1893

Arg Trp Gly Lys Pro Val

625

630

<210> 21

<211> 1893

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/gSK21MSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1890)

<400> 21

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30



ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144
Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

tig cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile



130 135 140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145 150 155 160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165 170 175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180 185 190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624
Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195 200 205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672
Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210 215 220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225 230 235 240



gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro



340	345	350	
aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104			
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp			
355	360	365	
tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152			
Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp			
370	375	380	
agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200			
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr			
385	390	395	400
ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248			
Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu			
405	410	415	
aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296			
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile			
420	425	430	
ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344			
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile			
435	440	445	



tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly



545 550 555 560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728
His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565 570 575

tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga 1776
Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580 585 590

tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824
Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595 600 605

aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc tac tcc atg gag cac ttc 1872
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe

610 615 620

cgc tgg ggc aag ccg gtg taa 1893
Arg Trp Gly Lys Pro Val

625 630

<210> 22

<211> 1923

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/ask21MSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1920)

<400> 22

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60



aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr



165	170	175	
gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576			
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu			
180	185	190	
aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624			
Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly			
195	200	205	
gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672			
Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr			
210	215	220	
ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720			
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr			
225	230	235	240
gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768			
Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala			
245	250	255	
gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816			
Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val			
260	265	270	



agt tai ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp



370 375 380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248
Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420 425 430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435 440 445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392
Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450 455 460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440
Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465 470 475 480



aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gea tct gct tcc gcc cct gga 1776



Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc gcc gag aag aag gac gag 1872

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610

615

620

ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc tgg ggc agc ccg ccc aag gac 1920

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

625

630

635

640

taa 1923

<210> 23

<211> 1923

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/gSK21MSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1920)

<400> 23

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50 55 60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65 70 75 80

caa aat gla acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata ict gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn



290 295 300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960
Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305 310 315 320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008
Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056
Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152
Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

tig tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala



500	505	510	
aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584			
Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys			
515	520	525	
cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632			
Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp			
530	535	540	
aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680			
Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly			
545	550	555	560
cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728			
His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser			
565	570	575	
tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga 1776			
Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly			
580	585	590	
tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824			
Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys			
595	600	605	



aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc gcc gag aag aag gac gag 1872

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610

615

620

ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc tgg ggc agc ccg ccc aag gac 1920

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

625

630

635

640

taa

1923

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding AS linker

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (33)

<400> 24

cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga

33

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

1

5

10



<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AS linker peptide

<400> 25

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

1

5

10

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding GS linker

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (33)



<400> 26

ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga

33

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GS linker peptide

<400> 27

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

<210> 28

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> DNA coding asK21 linker

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(108)

<400> 28

cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga tct gga tct aag aag 48

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1 5 10 15

aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag aaa aaa aag aag aag 96

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20 25 30

aaa aag aaa gga 108

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 29

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> asK21 linker peptide

<400> 29

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20 25 30

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 30

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding gsK21 linker

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(108)

<400> 30



ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga tct gga tct aag aag 48

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1 5 10 15

aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag aaa aaa aag aag aag 96

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20 25 30

aaa aag aaa gga

108

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 31

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> gsK21 linker peptide

<400> 31

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys



20

25

30

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 32

<211> 605

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6. 7R-F/asMSHa

<400> 32

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60



Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro



340	345	350
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp		
355	360	365
Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp		
370	375	380
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr		
385	390	395 400
Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu		
405	410	415
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile		
420	425	430
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile		
435	440	445
Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn		
450	455	460
Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe		
465	470	475 480



Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

595

600

605

<210> 33



<211> 615

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/asMSHb

<400> 33

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85 90 95



Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240



Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp



370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
435 440 445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
450 455 460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
500 505 510



Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

595

600

605

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

610

615

<210> 34

<211> 605

<212> PRT

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/gsMSHa

<400> 34

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100 105 110



Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255



Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr



385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435 440 445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450 455 460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515 520 525



Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

595

600

605

<210> 35

<211> 615

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/gsMSHb

<400> 35

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro



1	5	10	15												
Tyr	Asp	Thr	Glu	Thr	Gly	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Phe	Leu	Thr	Pro	Pro
	20							25						30	
Phe	Val	Ser	Pro	Asn	Gly	Phe	Gln	Glu	Ser	Pro	Pro	Gly	Val	Leu	Ser
	35						40							45	
Leu	Arg	Leu	Ser	Glu	Pro	Leu	Val	Thr	Ser	Asn	Gly	Met	Leu	Ala	Leu
	50						55						60		
Lys	Met	Gly	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Gly	Asn	Leu	Thr	Ser
	65						70					75			80
Gln	Asn	Val	Thr	Thr	Val	Ser	Pro	Pro	Leu	Lys	Lys	Thr	Lys	Ser	Asn
							85					90			95
Ile	Asn	Leu	Glu	Ile	Ser	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Glu	Ala	Leu
							100							105	110
Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Leu	Met	Val	Ala	Gly	Asn	Thr	Leu	Thr
							115							120	125
Met	Gln	Ser	Gln	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	His	Asp	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile
							130							135	140



Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
195 200 205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
210 215 220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285



Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile



420 425 430
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
435 440 445
Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
450 455 460
Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
465 470 475 480
Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
485 490 495
Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
500 505 510
Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
515 520 525
Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
530 535 540
Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
545 550 555 560



His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

595

600

605

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

610

615

<210> 36

<211> 630

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/asK21MSHa

<400> 36

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro



20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160



Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300



Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile



435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575



Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe

610

615

620

Arg Trp Gly Lys Pro Val

625

630

<210> 37

<211> 630

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/gSK21MSHa

<400> 37

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro



20	25	30
Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser		
35	40	45
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu		
50	55	60
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser		
65	70	75
80		
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn		
85	90	95
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu		
100	105	110
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr		
115	120	125
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile		
130	135	140
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln		
145	150	155
		160



Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300



Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile



435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575



Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe

610

615

620

Arg Trp Gly Lys Pro Val

625

630

<210> 38

<211> 640

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/ask21MSHb

<400> 38

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro



20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145 150 155 160



Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300



Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile



435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575



Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610

615

620

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

625

630

635

640

<210> 39

<211> 640

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/gsK21MSHb

<400> 39

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro



20	25	30
Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser		
35	40	45
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu		
50	55	60
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser		
65	70	75 80
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn		
85	90	95
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu		
100	105	110
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr		
115	120	125
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile		
130	135	140
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln		
145	150	155 160



Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300



Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile



435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575



Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610

615

620

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

625

630

635

640



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/86, A61K 48/00, A61P 35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/86, A61K 48/00, A61P 35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), REGISTRY (STN), CA (STN), GenBank/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JADWIGA CHROBOCZEK, et al. "The sequence of Adenovirus fiber: similarities and differences between serotypes 2 and 5", Virology(1987), Vol. 161, No. 2, p. 549-554	24-26
X	WO, 98/54346, A1 (Genvec, Inc.) 3. 12月. 1998 (03. 12. 98) & AU, 9876049, A	24-26
X	WO, 98/44121, A1 (Transgene S. A.) 8. 10月. 1998 (08. 10. 98) & FR, 276188, A1 & FR, 276189, A1 & AU, 9870547, A	24-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 04. 00

国際調査報告の発送日

16.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	NOBUSADA SHINOURA, et al. "Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant ElB-defective Adenovirus for gene therapy of Gliomas", Cancer Research (July, 1999), Vol. 59, No. 14, p. 3411-3416	1-26
A	SATOSHI YAMAGUCHI, et al. "Enhancement of retrovirus-mediated gene transduction efficiency by transient overexpression of the amphotropic receptor, GLVR-2", Nucleic Acids Research (1995), Vol. 23, No. 11, p. 2080-2081	1-26
A	WYSUN WONG, et al. "Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle, D-Phe] α -MSH in B16 melanoma cells", International Journal of Biochemistry & Cell Biology (1996), Vol. 28, No. 11, p. 1223-1232	1-20
A	WLTER SIEGRIST, et al. "Characterization of receptor for α -MSH on human melanoma cells", Cancer Research (1989), Vol. 49, No. 22, p. 6352-6358	1-26
A	YOKO YOSHIDA, et al. "Generation of fiber-mutant recombinant Adenoviruses for gene therapy of malignant glioma", Human Gene Therapy (1998), Vol. 9, No. 17, p. 2503-2515	1-26
A	THOMAS J. WICKHAM, et al. "Increased in vitro and in vivo gene transfer by Adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins", Journal of Virology (1997), Vol. 71, No. 11, p. 8221-8229	1-26
A	IGOR DMITRIEV., et al. "An Adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus receptor-independent cell entry mechanism", Journal of Virology (1998), Vol. 72, No. 12, p. 9706-9713	1-26
A	AN JIANG, et al. "Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies", Journal of Virology (1998), Vol. 72, No. 12, p. 10148-10156	1-26
A	SYLVIE LAQUERRE, et al. "Recombinant herpes simplex virus type 1 engineered for targeted binding to erythropoietin receptor-bearing cells", Journal of Virology (1998), Vol. 72, No. 12, p. 9683-9697	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01069

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SATOSHI YAMAGUCHI, et al. "Enhancement of retrovirus-mediated gene transduction efficiency by transient overexpression of the amphotropic receptor, GLVR-2", Nucleic Acids Research(1995), Vol.23, No.11, p.2080-2081	1-26
A	WYSUN WONG, et al. "Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle.D-Phe] α -MSH in B16 melanoma cells", International Journal of Biochemistry & Cell Biology(1996), Vol.28, No.11, p.1223-1232	1-20
A	WALTER SIEGRIST, et al. "Characterization of receptor for α -MSH on human melanoma cells", Cancer Research(1989), Vol.49, No.22, p.6352-6358	1-26
A	YOKO YOSHIDA, et al. "Generation of fiber-mutant recombinant Adenoviruses for gene therapy of malignant glioma", Human Gene Therapy(1998), Vol.9, No.17, p.2503-2515	1-26
A	THOMAS J. WICKHAM, et al. "Increased in vitro and in vivo gene transfer by Adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins", Journal of Virology(1997), Vol.71, No.11, p.8221-8229	1-26
A	IGOR DMITRIEV, et al. "An Adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus receptor-independent cell entry mechanism", Journal of Virology(1998), Vol.72, No.12, p.9706-9713	1-26
A	AN JIANG, et al. "Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies", Journal of Virology(1998), Vol.72, No.12, p.10148-10156	1-26
A	SYLVIE LAQUERRE, et al. "Recombinant herpes simplex virus type 1 engineered for targeted binding to erythropoietin receptor-bearing cells", Journal of Virology(1998), Vol.72, No.12, p.9683-9697	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/86, A61K 48/00, A61P 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/86, A61K 48/00, A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), REGISTRY (STN), CA (STN), GenBank/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JADWIGA CHROBOCZEK, et al. "The sequence of Adenovirus fiber: similarities and differences between serotypes 2 and 5", Virology (1987), Vol. 161, No. 2, p. 549-554	24-26
X	WO, 98/54346, A1 (Genvec, Inc.), 03 December, 1998 (03.12.98) & AU, 9876049, A	24-26
X	WO, 98/44121, A1 (Transgene S.A.), 08 October, 1998 (08.10.98) & FR, 276188, A1 & FR, 276189, A1 & AU, 9870547, A	24-26
PA	NOBUSADA SHINOURA, et al. "Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective Adenovirus for gene therapy of Gliomas", Cancer Research (July, 1999), Vol. 59, No. 14, p. 3411-3416	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 April, 2000 (26.04.00)

Date of mailing of the international search report
16.05.00

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.